

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520101153341

UDC _____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

舒林酸衍生物 K-80003 的大鼠药动学研究

Study on the pharmacokinetics of sulindac derivative

K-80003 in rats

洪颖

指导教师姓名: 朱铨 教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 5 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

非甾体抗炎药（Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, NSAIDs）是一类经典的药物，具有解热、镇痛和抗炎效果，至今仍广泛用于临床。对环氧化酶（cyclooxygenase, COX）的抑制作用为其作用的基础。近年来许多研究发现 NSAIDs 具有抗肿瘤效果。舒林酸为传统非选择性非甾体抗炎药，其也具有抗肿瘤活性。先前的机制研究大多是研究舒林酸作用于 COX 而产生的抗肿瘤作用，近年来有研究发现其也可依靠非 COX 机制而抗肿瘤。维甲酸受体（RXR）是舒林酸非 COX 机制中重要的一个受体，研究发现舒林酸可以通过与 RXR 结合，抑制肿瘤细胞的生长，诱导肿瘤细胞凋亡。如果可以对舒林酸进行结构改造提高其对于 RXR 的亲和能力，那么就有希望得到抗肿瘤活性更高的化合物。依照这个思路，本校其他课题组合成了舒林酸衍生物 K-80003，其对于 RXR 的亲合力更高，实验证实其对于肿瘤细胞的抑制作用也比舒林酸强，而且其对 COX-1 和 COX-2 的抑制作用很低，即其不会因抑制 COX 而产生相关的副作用，应用前景良好。

对于一个新的候选化合物，临床前药动力学研究是十分有必要的。本课题旨在通过了解 K-80003 及代谢物 M1 在大鼠体内的血药浓度经时变化规律、求得 K-80003 的主要药动学参数、考察 K-80003 及 M1 在大鼠体内各脏器的分布及 K-80003 的血浆蛋白结合特征，阐明 K-80003 在大鼠体内的动态变化规律及特点，为其成药性提供必要的药动力学依据。论文主要包括以下几部分内容：

1. 生物样品中 K-80003 分析方法的建立

通过遴选适合的血浆样品处理方法、流动相、检测条件等，建立利用 HPLC 法测定生物样品中 K-80003 的含量。经过比较乙酸乙酯、丙酮、氯仿、二氯甲烷、石油醚、乙醚等不同的萃取溶剂和甲醇、乙腈等直接沉淀蛋白的方法，最终确定以乙酸乙酯为有机萃取剂的液液萃取法来处理样品。对比不同物质，选用吲哚美辛作为内标。摸索不同的有机相种类、有机相与水相比比例、流速、柱温等条件，最终确定以下色谱条件：乙腈/水系统，采用梯度洗脱，洗脱程序为乙腈（%）：

0→6min, 40%→85%, 6min 以后, 85%至结束; 检测波长: 330nm; 流速: 0.8mL/min; 柱温: 30℃。

2.K-80003 血药浓度测定和药动学参数求取

大鼠经静脉给予低、中、高三个剂量(5、10、20mg/kg) K-80003 后, 于不同时间采集血浆样品, 处理后进样测得血药浓度。利用软件绘制血药浓度-时间曲线并求取药动参数。测得半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 68.11 ± 1.71 、 67.99 ± 5.20 和 68.43 ± 2.49 min, AUC 分别 1273.28 ± 85.15 、 4046.65 ± 332.61 和 9354.97 ± 911.98 min $\cdot\mu\text{g/mL}$, K-80003 在大鼠体内的转运过程符合线性药动学规律。

大鼠灌胃给予 20mg/kg 剂量的 K-80003 后, 得到口服药动学参数, 半衰期 $t_{1/2}$ 为 107.90 ± 6.87 min, AUC 为 6230.00 ± 520.46 min $\cdot\mu\text{g/mL}$, 口服生物利用度为 66.42%。

在实验中发现大鼠血浆中有代谢物 M1 存在, 因此对 M1 的基本药动规律也进行了研究。静脉注射 10mg/kg 剂量后, 于不同时间点取样, 得 $t_{1/2}$ 为 8.11 ± 0.71 h, 灌胃给药 20mg/kg 后, 得 $t_{1/2}$ 为 10.26 ± 0.98 h, 半衰期大大延长。

3.K-80003 在大鼠体内的组织分布研究

经过验证之前建立的方法仍然适用于组织样品中 K-80003 的含量测定。静脉给予 10mg/kg 的 K-80003 后, 于不同时间点取各组织进行测定, 结果表明, K-80003 在体内广泛分布, 在肝脏、肺、肾脏和心脏中浓度较高, 可透过血脑屏障, 在各组织中药物不发生蓄积。M1 在少数组织中也可检测得到。

4.K-80003 的血浆蛋白结合率

采用体外平衡透析法研究 K-80003 的血浆蛋白结合率。结果显示, 浓度为 10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度的血浆蛋白结合率分别为 85.70%、87.54%和 88.21%, 说明其与血浆蛋白的结合率较高。

关键词: K-80003; 药代动力学; 组织分布; 血浆蛋白结合率

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is a kind of classic drug, which have antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects, and is still widely used in clinical. Their effects are based on the inhibition of cyclooxygenase (COX). In recent years, many studies have found that NSAIDs have antitumor effect. Sulindac, as one of traditional non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs, it also have antitumor activity. Previous mechanism studies of sulindac's antitumor effect mostly focused on COX-dependent mechanism, but recent studies found that it may also depend on non-COX-dependent mechanism. Retinoic acid receptor (RXR) is an important receptor in non-COX-dependent mechanism, researchers found that sulindac could combine with RXR, then inhibit the growth of tumor cells and induce apoptosis of tumor cells. If we modificate the structure of sulindac to improve its affinity for RXR, then there is hope to get higher antitumor activity. According to this train of thought, another team synthesized sulindac derivatives K-80003. It has a higher affinity to the RXR which can induce a better antitumor effect. Experiments proved that the inhibition of tumor cells was also stronger than sulindac. Moreover, the inhibition of COX is lower, so it don't related the side effects by inhibition of COX. The application prospect is good.

For a new candidate compounds, preclinical pharmacokinetic study is very necessary. The following parts are included in this paper:

1. K-80003 analysis in biological samples

By selecting the suitable plasma sample processing method, mobile phase and detection conditions, set up HPLC method for determining the content of K - 80003 in biological samples. By comparing different extraction solvents such as ethyl acetate, acetone, chloroform, methylene chloride, petroleum ether, ether and direct protein deposition method such as methanol, acetonitrile and other, finally confirmed with ethyl acetate as organic extractant liquid-liquid extraction method to deal with the

samples. ethyl acetate as organic extractant liquid-liquid extraction method to deal with the samples. Compare the different material, and chose indomethacin as internal standard (IS). Grope for different kinds of organic phase, organic facies, water phase ratio, flow rate and column temperature conditions, and chromatographic conditions ultimately determine the following: acetonitrile/water system, using the gradient elution, elution program was: for acetonitrile (%) : 0-6 min, 40% to 85%, after 6 min, 85% to end; detection wavelength of 330 nm; The flow rate of 0.8 mL/min; Column temperature: 30 °C.

2. K-80003 blood drug concentration determination and pharmacokinetic parameters

Following a single i.v. administration of K-80003 at 5, 10 and 20 mg/kg to rats, the plasma concentration-time curves and pharmacokinetic parameters conformed to a 2-compartment model. Measured half-life were 68.11 ± 1.71 、 67.99 ± 5.20 和 68.43 ± 2.49 min, and the AUC were 1273.28 ± 85.15 、 4046.65 ± 332.61 和 9354.97 ± 911.98 min • μ g/mL, respectively. The results showed an apparent linear dose-proportionality.

Following a single p.o. administration of K-80003 at 20 mg/kg to rats, we got the pk parameters of oral administration. The half-life was 107.90 ± 6.87 min, AUC was 6230.00 ± 520.46 . The oral bioavailability was 66.42%.

In experiments in rat plasma, we found the presence of the metabolite (M1). The basic pharmacokinetic study of M1 were researched. Following a single i.v. administration of K-80003 at 10 mg/kg and got samples at different time. The half-life was 8.11 ± 0.71 h. Following a single p.o. administration of K-80003 at 20 mg/kg, we got the half-life of 10.26 ± 0.98 h, which greatly extended the half-life.

The results will provide valuable foundations for further clinical pharmacokinetic studies of K-80003.

3. Tissue distribution and excretion studies of Pd-Ia in rats

A rapid, sensitive and specific LC-MS/MS method for quantitative analysis of K-80003 in rat biological samples has been developed and validated. Following a single i.v. administration of K-80003 at 10 mg/kg to rats, tissues were collected at

predetermined time points, respectively. The results showed that K-80003 underwent a rapid and wide distribution and no long-term accumulation of K-80003 in tissues. The major distribution tissues of K-80003 in rats were liver, lung kidney and heart, and high polarity enabled K-80003 to cross the blood-brain barrier. M1 was also detected in some tissues.

The present disposition and excretion studies of Pd-Ia in rats will provide helpful information for development of suitable dosage forms and clinical references on rational administration.

4. Plasma protein binding rate study of K-80003

The plasma protein binding rate was studied by *vitro* equilibrium dialysis. The results showed that the plasma protein binding rates of 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ were 85.70%, 87.54% and 88.21%, respectively.

Keywords: K-80003; Pharmacokinetics; Tissue distribution; plasma protein binding rate

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 抗肿瘤药物简介.....	1
1.2 NSAIDs 与抗肿瘤.....	2
1.2.1 NSAIDs 简介	2
1.2.2 NSAIDs 的抗炎机制.....	2
1.2.3 NSAIDs 的抗肿瘤机制.....	3
1.3 舒林酸及其衍生物.....	8
1.4 药动学在新药研究中的作用.....	10
1.5 本课题研究内容.....	11
第二章 生物样品中 K-80003 分析方法的建立.....	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验仪器.....	13
2.1.2 实验药品与试剂.....	14
2.1.3 实验动物.....	14
2.2 实验方法.....	14
2.2.1 空白生物样本的制备	14
2.2.2 溶液配制.....	14
2.2.3 标准血浆样品制备.....	15
2.2.4 血浆样本预处理.....	15
2.2.5 色谱条件.....	15
2.2.6 K-80003 体内分析方法的验证.....	16
2.3 实验结果.....	17
2.3.1 检测波长的选择.....	17
2.3.2 方法的专属性.....	18
2.3.3 标准曲线与定量下限.....	20

2.3.4 精密度与准确度.....	21
2.3.5 提取回收率.....	22
2.3.6 稳定性考察.....	22
2.3.7 血浆样品稀释对于 K-80003 浓度测定的影响.....	23
2.4 讨论.....	24
2.4.1 方法学优化.....	24
2.4.2 样品预处理.....	28
2.5 小结.....	31
第三章 K-80003 在大鼠体内的药代动力学研究.....	32
3.1 实验材料.....	32
3.2 实验方法.....	32
3.2.1 溶液配制.....	32
3.2.2 色谱条件.....	33
3.2.3 大鼠体内药代动力学研究.....	33
3.2.4 血浆样品处理.....	35
3.2.5 样品分析.....	35
3.2.6 数据处理.....	35
3.3 结果.....	35
3.3.1 K-80003 单次静脉给药药动学研究.....	35
3.3.2 K-80003 单次口服给药药动学研究.....	38
3.3.3 代谢物 M1 的药动学研究.....	40
3.4 讨论.....	43
3.5 小结.....	45
第四章 K-80003 在大鼠体内的组织分布研究.....	47
4.1 实验材料.....	47
4.2 实验方法.....	47
4.2.1 溶液配制.....	47
4.2.2 色谱条件.....	47
4.2.3 大鼠组织中 K-80003 分析方法的建立.....	47
4.2.4 大鼠体内组织分布实验.....	49

4.3 实验结果.....	49
4.3.1 各组织分析方法的建立.....	49
4.3.2 大鼠组织分布实验.....	57
4.4 讨论	65
4.5 小结	66
第五章 K-80003 的血浆蛋白结合率研究.....	67
5.1 实验材料.....	67
5.1.1 实验仪器.....	67
5.1.2 实验药品与试剂.....	67
5.2 实验方法.....	68
5.2.1 溶液配制.....	68
5.2.2 色谱条件.....	68
5.2.3 透析袋的活化.....	68
5.2.4 样品处理.....	68
5.2.5 血浆蛋白结合率实验.....	68
5.3 实验结果.....	70
5.3.1 缓冲液中药物测定的线性范围和定量下限.....	70
5.3.2 透析平衡时间考察.....	70
5.3.3 透析袋吸附率考察.....	71
5.3.4 血浆蛋白结合率的测定.....	71
5.4 讨论	72
5.5 小结	73
第六章 结论与展望	74
附 录	76
参考文献.....	78

Content

Abstract (Chinese).....	I
Abstract (English).....	III
Chapter 1 Preface	1
1.1 Introduction to anticancer drugs	1
1.2 NSAIDs and anticancer.....	2
1.2.1 Introduction to NSAIDs.....	2
1.2.2 The anti-inflammatory mechanism of NSAIDs.....	2
1.2.3 Anti-tumor mechanism of NSAIDs	3
1.3 Sulindac and its derivative	8
1.4 Effects of pharmacokinetics on new drugs research	10
1.5 The content of this research.....	11
Chapter 2 Establishment of K-80003 analytical methods in biological samples	13
2.1 Materials.....	13
2.1.1 Experimental instruments	13
2.1.2 Experimental Chemicals and reagents.....	14
2.1.3 Experimental animals	14
2.2 Methods.....	14
2.2.1 Preparation of the blank biological sample	14
2.2.2 Preparation of solutions	14
2.2.3 Preparationof standard plasma samples	15
2.2.4 Preparationof plasma samples	15
2.2.5 Conditions of HPLC.....	15
2.2.6 Authentication for analysis method of K-80003 in vivo	16
2.3 Results.....	17
2.3.1 Selection of detection wavelength	17
2.3.2 The specificity of the method.....	18
2.3.3 The standard curve and the lower limit of quantification	20
2.3.4 Precision and accuracy	21
2.3.5 Extraction recovery	22

2.3.6 Research of stability	22
2.3.7 Plasma samples dilution for the determination of the concentration of K-80003 ..	23
2.4 Discussion	24
2.4.1 Optimize of the method	24
2.4.2 Preparation of samples.....	28
2.5 Conclusion.....	31
Chapter 3 Pharmacokinetic study in rats	32
3.1 Materials.....	32
3.2 Methods.....	32
3.2.1 Preparation of solutions	32
3.2.2 Conditions of HPLC.....	33
3.2.3 Pharmacokinetic study in rats.....	33
3.2.4 Preparation of blood samples	35
3.2.5 Sample analysis	35
3.2.6 Data processing.....	35
3.3 Results.....	35
3.3.1 Pharmacokinetic study after single intravenous administration	35
3.3.2 Pharmacokinetic study after single oral administration.....	38
3.3.3 Pharmacokinetic study of M1	40
3.4 Discussion	43
3.5 Conclusion.....	45
Chapter 4 Tissue distribuion of k-80003 in rats	47
4.1 Materials.....	47
4.2 Methods.....	47
4.2.1 Preparation of solutions	47
4.2.2 Conditions of HPLC.....	47
4.2.3 Establishment of K-80003 analytical methods in tissue samples	47
4.2.4 Tissue distribuion of k-80003 in rats.....	49
4.3 Results.....	49
4.3.1 Establishment of K-80003 analytical methods in tissue samples	49

4.3.2 Tissue distributuion of k-80003 in rats.....	57
4.4 Discussion	65
4.5 Conclusion.....	66
Chapter 5 Plasma protein binding rate study of K-80003	67
5.1 Materials.....	67
5.1.1 Experimental instruments	67
5.1.2 Experimental Chemicals and reagents.....	67
5.2 Methods.....	68
5.2.1 Preparation of solutions	68
5.2.2 Conditions of HPLC.....	68
5.2.3 Activation of the dialysis bag	68
5.2.4 Preparation of samples.....	68
5.2.5 Plasma protein binding rate study of K-80003	68
5.3 Results.....	70
5.3.1 The standard curve and the lower limit of quantification in buffer	70
5.3.2 The study of dialysis equilibrium time	70
5.3.3 The study of dialysis bags adsorption rate	71
5.3.4 Determination of plasma protein binding rate.....	71
5.4 Discussion	72
5.5 Conclusion.....	73
Chapter 6 Conclusions and prospects	74
Appendix	76
References	78

第一章 前言

1.1 抗肿瘤药物简介

肿瘤是一种严重危害人类健康的疾病。由于受到环境等因素的影响，肿瘤的发生率在逐年升高，致死率也一直居高不下。据美国国立癌症研究院（National Cancer Institute, NCI）2012 年统计数据^[1]显示，在美国每 4 例死亡中就有一例是死于肿瘤，在全球范围来看，肿瘤已位列人类致死病因的第二位^[2]。抗肿瘤药物也成为了近十几年研究的热点。虽然目前有关肿瘤的基础研究已经取得了很大的突破，治疗使患者的生存时间明显延长，对于白血病、恶性淋巴瘤在临床上已有治愈的可能，但是对于实体瘤的治疗仍未达到满意的效果，而且仍然缺乏安全、有效、对人体副作用小的药物。

肿瘤的发生机制多为机体在各种致癌因素的作用下，局部组织的细胞在基因水平上失去对其生长的调控，导致其克隆性异常增生而形成异常病变。抗肿瘤药物从作用机制上可以分为以下几类：（1）干扰核酸生物合成，通过抑制核酸合成中的酶或者作为伪底物掺入核酸从而影响核酸的功能，如阿糖胞苷、甲氨蝶呤等；（2）直接破坏 DNA 结构和功能，通过共价键直接与核酸结合，破坏 DNA 的生理完整性，使 DNA 功能丧失，如烷化剂、顺铂等；（3）干扰 RNA 转录，如放线菌素、柔红霉素等；（4）影响蛋白质合成和功能，如紫杉醇、秋水仙碱、长春碱类等；（5）影响体内激素平衡，干扰和抑制肿瘤细胞增殖，如肾上腺皮质激素等。目前用于抗肿瘤的药物绝大多数是细胞毒性药物，许多药物对肿瘤细胞和正常细胞的选择性低，在杀死肿瘤细胞的同时也严重影响了正常细胞的功能，造成了严重的副作用，如胃肠道刺激、对重要组织的影响、骨髓抑制等。因此，研究者们把抗肿瘤药物的研发重点放在了提高药物的选择性，降低毒副作用上。

肿瘤的发生过程非常复杂，涉及众多功能分子、信号蛋白、受体等，它们之间相互作用于影响，这也为抗肿瘤药物靶点设计提供了更多的可能。目前新型抗肿瘤药物的靶点和手段主要有^[3]：（1）以细胞信号转导分子为靶点，如 MAPK 信号转导通路、络氨酸蛋白激酶、法尼基转移酶等；（2）以新生血管为靶点的新

生血管抑制剂；(3) 以端粒酶为靶点的端粒酶抑制剂；(4) 减少癌细胞的脱落、粘附与基底膜降解的抗转移药；(5) 降低肿瘤细胞耐药性的耐药逆转剂；(6) 增强放化疗治疗效果的放化疗增敏剂；(7) 以癌基因和抑癌基因为靶点等。

1.2 NSAIDs 与抗肿瘤

1.2.1 NSAIDs 简介

非甾体抗炎药是一类不含有甾体结构的抗炎药。首个 NSAID 是阿司匹林，于 1898 年合成，至今已经有 100 多年历史，如今仍然广泛用于治疗或预防各种风湿性疾病和心脑血管疾病。NSAIDs 具有解热、镇痛，多数还具有抗炎、抗风湿等效果，主要用于炎症免疫性疾病的对症治疗，广泛用于腰背疼痛、牙痛、急性痛风、痛经、术后疼痛等，100 多年来已有百余种上千个品牌上市，其临床使用范围也在不断扩大。

NSAIDs 根据结构可以分为：甲酸类、乙酸类、丙酸类、昔康类、昔布类、吡唑酮类和其他。根据对 COX 作用的不同可以分为：COX 非特异性抑制剂、COX-1 选择性抑制剂、COX-2 选择性抑制剂等。

1.2.2 NSAIDs 的抗炎机制

NSAIDs 主要是通过抑制 COX 达到解热、镇痛、抗炎效果。COX 是由花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 合成前列腺素 (prostaglandin, PG) 所必须的酶，PG 广泛存在于人的组织与体液中，具有多种生物学活性，是人体中重要的一种致热、致痛和致炎物质，NSAIDs 抑制了 PGs 的合成，从而抑制了 PGs 所引起的炎症反应。

1989 年 COX 被鉴定出存在两种同工酶—COX-1 和 COX-2^[4]。前者为结构型，主要低浓度地表达于胃、血管、肾脏等组织中，参与胃粘膜血流、胃粘液分泌的调节，保护胃肠功能等多种生理过程，也参与血管舒缩、血小板聚集及肾功能等的调节。后者为诱导型酶，正常生理状态下在大多数组织中检测不到，可由各种损伤性化学、生物和物理因子诱导产生，能增加 PGs 的合成。PG 具有多种类型，分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 等不同亚型，各有不同的生理效应，如 PGE 和 PGF 可使妇女子宫强烈收缩，可用于终止妊娠和催产，PGE₁、PGE₂ 和 PGA 能抑制胃液的分泌，保护胃壁细胞，可以用于治疗胃溃疡、出血性胃炎及肠炎，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库